Über das Veratrin mit einem Beitrag zur chemischen Konstitution seiner Bestandteile

---

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Hans Stausberg

Würzburg 1954

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Auterhoff
2. Referent: Prof. Dr. R. Dietzel

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Sonderdruck aus
„Archiv der Pharmazie"
287./59. Band, Heft 1, Seite 27—34
Verlag Chemie G. m. b. H., Weinheim/Bergstraße

1276. H. Auterhoff und H. Stausberg

Über einige Eigenschaften des handelsüblichen Veratrins

3. Mitteilung

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg
Dir. Prof. Dr. *R. Dietzel*

(Eingegangen am 15. September 1953)

Veratrin besteht durchschnittlich aus etwa 74% Cevadin und 26% Veratridin. Trotz der Bemühungen zahlreicher Bearbeiter ist es bisher nicht gelungen, Methoden auszuarbeiten, die eine gleichzeitige quantitative Gewinnung beider Alkaloide aus dem handelsüblichen Gemisch gestatten. In einer früheren Mitteilung[1]) wiesen wir darauf hin, daß bei den verschiedenen Aufarbeitungsmethoden häufig ein Produkt anfällt, das Cevadin und Veratridin etwa zu gleichen Teilen enthält. Es drängte sich somit die Vermutung auf, daß Veratrin kein einfaches physikalisches Gemisch darstellt, sondern beide Komponenten in einer lockeren Verbindung enthält. Diese Frage sollte durch die Bestimmung einer Reihe physikalisch-chemischer Konstanten für Lösungen, die Cevadin und Veratridin in wechselnden Mengenverhältnissen enthalten, geklärt werden. In Anlehnung an eine von *W. Paul* und *H. Rieder*[2]) an anderen Mischpräparaten durchgeführte Untersuchung wurden von verschiedenen „Veratrin"-Lösungen folgende Eigenschaften bestimmt und mit denjenigen der Reinalkaloidlösungen verglichen: 1. Dichte, 2. Viskosität, 3. Oberflächenspannung, 4. Brechungsindex, 5. optische Drehung, 6. Ultraviolettabsorption.

---

[1]) *H. Auterhoff*, Arch. Pharm. Ber. dtsch. pharm. Ges. *286/58*, 69 (1953).
[2]) *W. Paul* und *H. Rieder*, Arch. Pharm. Ber. dtsch. pharm. Ges. *279/51* 1 (1941).

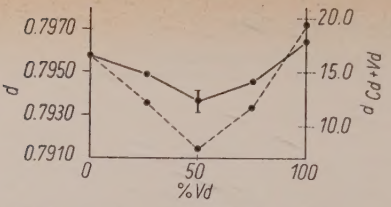


Abb. 1. Dichte von „Veratrin"-Lösungen in Methanol. Konzentration: 100 mg Alkaloid bzw. Alkaloidgemisch in 25 ml. Maximaler Fehler der Einzelbestimmung: ± 0,0005, entsprechend |—|

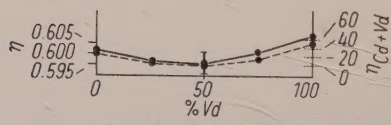


Abb. 2. Viskosität von „Veratrin"-Lösungen in Methanol. Konzentration: 100 mg Alkaloid bzw. Alkaloidgemisch in 25 ml. Maximaler Fehler der Einzelbestimmung: ± 0,005, entsprechend |—|

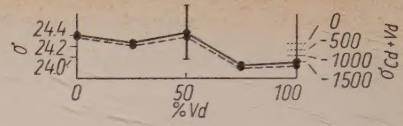


Abb. 3. Oberflächenspannung von „Veratrin"-Lösungen in Methanol. Konzentration: 100 mg Alkaloid bzw. Alkaloidgemisch in 25 ml.
Maximaler Fehler der Einzelbestimmung: ± 0,5, entsprechend |—|

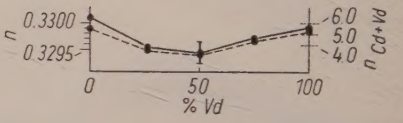


Abb. 4. Brechungsindex von „Veratrin-Lösungen in Methanol. Konzentration: 100 mg Alkaloid bzw. Alkaloidgemisch in 25 ml.
Maximaler Fehler der Einzelbestimmung: ± 0,0002, entsprechend |—|

Bei Ausschluß chemischer Reaktionen zeigen physikalische Eigenschaften von Lösungen erfahrungsgemäß additives Verhalten. Trägt man graphisch die Eigenschaftswerte als Funktion des Mischungsverhältnisses auf, so muß bei exakter Gültigkeit der additiven Mischungsregel eine Gerade resultieren. Entstehen aber durch Zusammentreten von Molekülen größere Aggregate, so zeigen die entsprechenden Kurven deutliche Minima bzw. Maxima.

In den Abbildungen 1—6 sind die physikalischen Eigenschaften von Lösungen verschiedener Veratridin-Cevadin-Mischungen dargestellt. Die ausgezogenen Kurven (Abb. 1—4) zeigen die gemessenen Eigenschaftswerte, die gestrichelten — zur Eliminierung des Einflusses des Lösungsmittels — die Werte:

E_{Cd+Vd}, gemäß der Formel[2]):

$$E_{Cd+Vd} = \frac{E_{Lsg} - (1 - x_1 - x_2) \cdot E_{LsgM}}{x_1 + x_2},$$

worin bedeuten:

Cd = Cevadin,
Vd = Veratridin,
E_{Cd+Vd} = Summe der gesuchten Eigenschaften der gelösten Stoffe Cd und Vd,
x_1 = Molenbruch des Stoffes Cd,
x_2 = Molenbruch des Stoffes Vd,
E_{Lsg} = Eigenschaft der Lösung,
E_{LsgM} = Eigenschaft des Lösungsmittels.

$$x_1 = \frac{\text{Mole Cd}}{\text{Mole Cd} + \text{Mole Vd} + \text{Mole LsgM}}$$

Übereinstimmend werden gewisse Unstetigkeiten beim 50%igen Gemisch beobachtet. Da in allen Fällen nur Mittelwerte zahlreicher Einzelmessungen mit Stoffen verschiedener Herstellung ausgewertet wurden, sind Zufälligkeiten im Verlauf der Kurven weitgehend ausgeschaltet. Bei Dichte, Viskosität und spezifischer Drehung liegen die Differenzen benachbarter Werte wohl nahe den Fehlergrenzen, die Kurven zeigen aber unverkennbae Minima. Nicht zu verwerten ist die Oberflächenspannungskurve. Recht deutlich verändert sich dagegen der Brechungsindex. Auffällig ist auch der Unterschied zwischen der experimentellen und der berechneten UV-Absorptionskurvedes 50%igen Produktes. Die Spektren eines aus reinen Einzelkomponenten gemischten und eines aus der Gegenstromverteilung gewonnenen 50%igen Produktes zeigten gute Übereinstimmung. Auch der Befund, daß Derivate mit je 50% Cevadin und Veratridin besser wasserlöslich sind als die reinen Alkaloide, spricht dafür, daß Veratridin und Cevadin zu — wenn auch lockerer — Assoziation neigen. Durch diese Erkenntnis erfahren die unvollkommenen Ergebnisse der Versuche zur Trennung von Cevadin-Veratridin-Gemischen, die Lösungsgleichgewichte zwischen organischen Phasen zur Grundlage haben, eine befriedigende Erklärung.

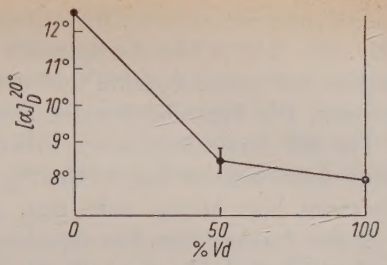


Abb. 5. Spezifische Drehung von „Veratrin"-Lösungen in Äthanol. Konzentration: 4%ig. Maximaler Fehler der Einzelbestimmung: ± 0,3°, entsprechend |—|

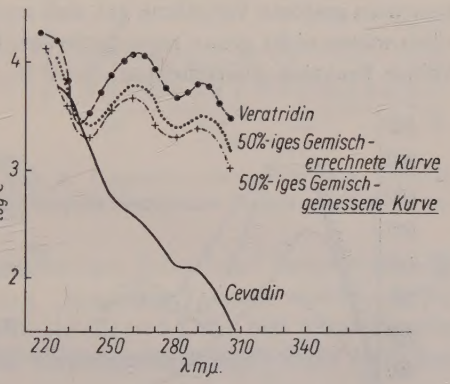


Abb. 6. UV-Absorptionsspektren von „Veratrin"-Lösungen in Äthanol.

Über Nacharbeitung und Verbesserung der älteren Veratrin-Aufarbeitungsmethoden wurde bereits berichtet[1]). An neueren Verfahren benutzten wir Chromatographie und Gegenstromverteilung.

Auf adsorptionschromatographischem Wege konnte trotz Variation des Adsorbens und Lösungsmittels keine vollkommene Trennung von Veratridin und Cevadin erreicht werden. Das beste Ergebnis brachte noch die Chromatographie an Aluminiumoxyd nach *Brockmann* mit dem Lösungsmittelgemisch Benzol-Methanol im Verhältnis 10 : 1. Etwa 10% des eingesetzten käuflichen Veratrins wurden als 45,6% Veratridin enthaltendes Produkt in der ersten Elutionsfraktion wiedergewonnen.

Bessere Ergebnisse erzielten wir mit der Verteilungschromatographie. Eine Übertragung der papierchromatographischen Methode[1]) auf präparative Verhältnisse am Zellulosepulver ließ sich des ungünstigen Lösungsmittels (Phenol)

wegen nicht durchführen. Mit Silikagel, Phosphat-Zitrat-Puffer p_H 5,6 und Benzin-(Kp. 100—140°)-Chloroformgemisch im Verhältnis 1 + 3 wurde in mehreren Versuchen fast reines Cevadin und ein 70% Veratridin enthaltendes Präparat gewonnen. Die Versuche konnten aber nicht mit Sicherheit reproduziert werden.

Für die Gegenstromverteilung wählten wir zunächst als Lösungsmittel Schwefelkohlenstoff und 60 Gew.%-igen Äthanol. Der Verteilungskoeffizient des Veratrins liegt hierbei nahe eins. Als Vorversuch wurde eine Verteilung über 8 Stufen durchgeführt. Die experimentelle sowie die nach *E. Hecker* und *P. Karlson*[3]) theoretisch berechnete Kurve sind in Abbildung 7 dargestellt. Ihr Vergleich zeigt, daß ungehinderte Verteilung nicht stattfindet. Aus den Maxima wurden nur Mischpräparate erhalten. — Mit den gleichen Lösungsmitteln wurde zweimal die Verteilung über 16 Stufen durchgeführt. Die durch Assoziation der Einzelkomponenten gestörte Verteilung gab sich noch deutlicher zu erkennen und die Ergebnisse waren nicht genau reproduzierbar. Ein Veratridingehalt von 53% wurde in keiner Fraktion überschritten.

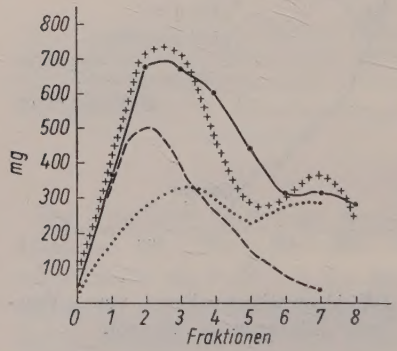


Abb. 7. Veratrin-Gegenstrom-Verteilung über 8 Stufen. — — — Fraktionen aus CS_2 · · · · · · Fraktionen aus C_2H_5OH ——— Gesamtfraktionen + + + + + berechnete Kurve

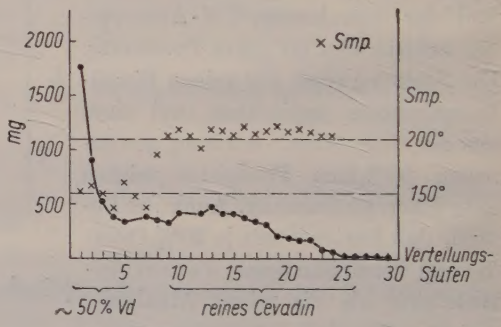


Abb. 8. Gegenstromverteilung von Veratrin über 150 Stufen nach der Methode der „einphasigen Entnahme". Benzin 60-Gew.-%iger Äthanol.

Günstigere Ergebnisse wurden mit dem Lösungsmittelpaar: 60 Gew.%-iger Äthanol und Benzin (Kp. 100—140°) erzielt. Der Verteilungskoeffizient liegt hierbei erheblich unter eins, so daß die einfache Verteilung nach dem Grundprozeß nicht anwendbar ist. Daher wurde die Arbeitsweise der „einphasigen Entnahme"[3]) angewandt. Wir bedienten uns einer *Grubhofer*schen[4]) Verteilungsapparatur mit 30 Elementen zu je 200 ccm oberer und unterer Phase. Entnommen wurden am Ende der Batterie jeweils die Benzinphasen und dem ersten Element wieder zugeführt. Nach 150 Verteilungsschritten, als die Substanz das 25. Element erreicht hatte, wurde der Prozeß unterbrochen. Die durch Abdestillieren der Lösungsmittel erhaltenen Substanzmengen sind aus Abbildung 8 ersichtlich. In den ersten

[3]) *E. Hecker* und *P. Karlson*, Z. Naturforsch. *5b*, 237 (1950).
[4]) *N. Grubhofer*, Chemie-Ing.-Techn. *22*, 209 (1950).

4 Fraktionen liegt der Vd-Gehalt bei etwa 50% und sinkt dann in den Fraktionen 5 bis 8 auf 0 ab. Von Fraktion 9 an findet sich nur reines Cevadin vom Schmp. über 200°. Von den insgesamt verteilten 10 g Veratrin wurden 4,76 g reines Cevadin und etwa 4,2 g ungefähr 50%iges Cevadin-Veratridin-Gemisch gewonnen. Den Rest stellen Übergangsfraktionen dar. Veratrin verhält sich demnach bei dieser Verteilung wie ein Gemisch eines Assoziates aus Cevadin und Veratridin im Verhältnis 1 : 1 und Cevadin.

Da es mit Lösungsmitteln allein auf rein physikalischer Grundlage nicht gelang, eine vollkommene Verteilung von Cevadin und Veratridin zu erreichen, wurde versucht, den Trenneffekt durch Salzbildung in wäßriger Phase zu vergrößern. Wir wählten 2,8%ige Essigsäure und Chloroform. In der *Grubhofer*schen Apparatur wurde mit je 200 ccm oberer und unterer Phase gearbeitet. Nach Durchführung eines Grundprozesses über 10 Stufen wurde die Verteilung noch über 5 Stufen nach der Methode der „einphasigen Entnahme" fortgesetzt. Das Ergebnis ist aus Abbildung 9 ersichtlich. Von 10 g Veratrin wurden 2,82 g 79,4%iges Veratridin, 2,33 g 10,2%iges Veratridin und 3,82 g fast reines Cevadin gewonnen. Ein Vorversuch mit kleineren Veratrinmengen ergab sogar 100%iges Veratridin.

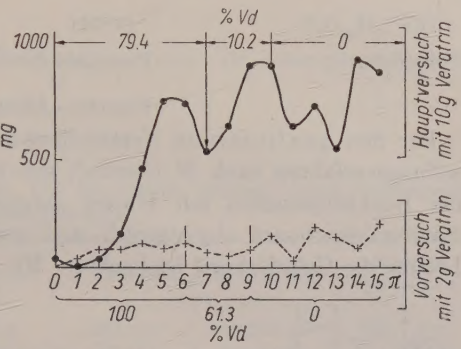


Abb. 9. Gegenstromverteilung von Veratrin im System: verdünnte Essigsäure/Chloroform.

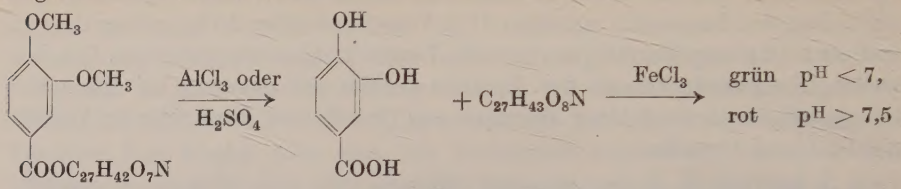
Die Bestimmung des Veratridin-Gehaltes in Mischungen von Veratridin und Cevadin

Die Kurvenbilder zeigen, daß mit Hilfe physikalischer Konstanten Veratridin-Cevadin-Gemische nicht eindeutig charakterisiert werden können. Die Schaffung andersartiger Methoden zur präzisen Bestimmung des Veratridin- bzw. Cevadin-Gehaltes in Gemischen war daher eine grundlegende Forderung. Eine geeignete Methode ist von uns bereits beschrieben worden[1]). Sie beruht auf Verseifung der Esteralkaloide mit alkoholischer Kalilauge und anschließender Bestimmung der Angelika- und Veratrumsäure, die durch Wasserdampfdestillation getrennt werden. Die Durchführung dieser Bestimmungen erfordert aber relativ viel Zeit.

Versuche, die verschiedene Basenstärke des Veratridin ($pK_b = 5{,}7$) und Cevadin ($pK_b = 5{,}15$) für analytische Bestimmungen auf dem Wege der potentiometrischen Titration auszunutzen, schlugen fehl, da auch Gemische nur einen p_H-Sprung aufweisen. Daß es unmöglich ist, im Handelsveratrin oder ähnlichen Mischungen beide Komponenten auf diese Weise zu erfassen, zeigen auch theoretische Überlegungen an Hand eines logarithmischen Säurebasendiagrammes nach *Brönstedt*[5]).

[5]) Einzelheiten siehe *H. Stausberg*, Dissertation Würzburg 1953.

Eine für serienmäßige Untersuchungen gut geeignete Methode ließ sich auf folgender Reaktion aufbauen:



Veratridin — Protokatechusäure + Veratrin - Alkamin

Für den qualitativen Veratridinnachweis wird die Substanz trocken (Verseifungsverfahren nach *M. Oberlin*[6]) mit wasserfreiem Aluminiumchlorid erhitzt, der Reaktionskuchen mit Wasser aufgenommen, die überschüssige Säure mit Natriumbikarbonat abgestumpft und nach Zusatz verdünnter Eisen-3-chlorid-Lösung die Grünfärbung beobachtet. Mit dieser Reaktion lassen sich noch 2 bis 3 mg Veratridin erkennen. Zur quantitativen Bestimmung ist es vorteilhafter, mit 72%iger Schwefelsäure bei 170—180° zu verseifen, dann vorsichtig mit Wasser zu verdünnen, Eisenchloridlösung hinzuzugeben und mit Ammoniak auf etwa p_H 9 einzustellen. Die Extinktion des Filtrates wird im *Pulfrich*-Photometer mit dem Filter S 50 gemessen. Die Wahl dieses Filters erfolgte auf Grund der typischen Farbkurve, die im Abbildung 10 den Farbkurven der Protokatechusäure und des Brenzkatechins gegenübergestellt ist. Die Eichkurve wurde mit reinem Veratridin, welches UV-spektroskopisch auf seine Reinheit geprüft war, und Veratridin-Cevadin-Mischungen, die nach der azidimetrischen Verseifungsmethode standardisiert waren, aufgestellt. Der mittlere Fehler der Einzelbestimmungen beträgt im günstigen Meßbereich von 10 bis 40 mg Veratridin ± 2 mg.

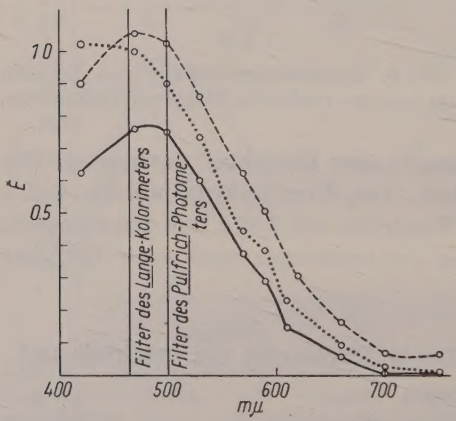


Abb. 10. Typische Farbkurven. Eisen-III-chlorid-Reaktionen bei $p_H \sim 8$ — — — Protokatechusäure ——— Veratrin (gespalten mit 72%iger H_2SO_4) ····· Brenzkatechin

Beschreibung der Versuche

Die Dichte

wurde in 25 ml-Pyknometern bestimmt und nach DAB. 6 berechnet. Zur Einhaltung der Temperatur diente ein Thermostat nach *Höppler*: 20° ± 0,05°.

Die Viskosität

wurde mit dem *Ostwald-Englers*chen Kapillar-Viskosimeter mit den zur Dichtebestimmung benutzten Lösungen bei 20° ± 0,05° bestimmt. Die Eichung erfolgte mit Wasser.

[6]) *M. Oberlin*, Arch. Pharm. Ber. dtsch. pharm. Ges. *265/37*, 256 (1927).

Die Oberflächenspannung

wurde nach der Tropfenzahlmethode mit dem Stalagmometer nach *Traube* bestimmt. Die Eichung erfolgte mit Wasser.

Der Brechungsindex

wurde mit dem *Zeiß*-Polarimeter nach *Lippich* bestimmt. Die Drehungswinkel wurden je 10mal abgelesen. Die angegebenen Drehungen sind Mittelwerte aus je 3 bis 5 verschiedenen Ansätzen.

UV-Absorptionsspektren

wurden mit einem UNICAM S.P. 500-Gerät aufgenommen; als Lösungsmittel diente 96 Vol.-/%iger Äthanol.

Chromatographische Versuche

a) Beispiel mit Al_2O_3-*Brockmann*:

Allihnrohr ∅ 15 mm, Säulenlänge 20 cm. Die Fraktionen wurden durch vollständige Elution der im UV-Licht sichtbaren Zonen gewonnen.

Lösungsmittel	Einwaage	1. Fraktion	2. Fraktion	3. Fraktion	Summa gewonnen
Benzol + CH_3OH 9 + 1	650 mg Veratrin	71,1 mg F. 143° 45,6% Vd	556 mg F. 134 25,8%	anorgan. Bestandteile	627,1 mg (= 96,5%)

b) Beispiel mit Silikagel „*Merck*“:

In ein Allihnrohr wurde ein Gemisch aus 20 g Silikagel und 10 ccm Phosphat-Zitratpuffer vom p_H 5,6 gefüllt und darüber eine Mischung von 10 g Silikagel mit 0,5 g Veratrin und 5 ccm des gleichen Puffers geschichtet.

Lösungsmittel	Einwaage	1. Fraktion	2. Fraktion	3. Fraktion	Summa gewonnen
Benzin Kp. 100 — 140° + $CHCl_3$ 1 + 3	500 mg Veratrin	55,5 mg F. 150° 70% Vd	304,6 mg F. 198° 0% Vd	—	360,1 mg (= 72%)

Gegenstromverteilung

a) Lösungsmittel: Schwefelkohlenstoff — darin löst sich Veratrin 1 : 16,5; 60 Gew.-%iger Äthanol — ‚Veratrinlöslichkeit 1 : 17. Obere und untere Phasen je 50 ccm. Substanzmenge: 3,75; wiedergefunden wurden 100%. Die Schmelzpunkte sämtlicher Fraktionen lagen bei 140—150°. Im ersten Maximum war Cevadin, im zweiten Veratridin angereichert. Berechnung der theoretischen Kurve siehe *H. Stausberg*[5]).

b) Lösungsmittel: Benzin Kp. 100—140° und 60 Gew.-%iger Äthanol. Verteilungsapparatur nach *N. Grubhofer* mit 30 Elementen; Einzelphasen je 200 ccm. Es wurde die Methode der „einphasigen Entnahme“ angewandt und über 150 Verteilungsschritte durchgeführt. Die Stoffverteilung in den einzelnen Phasen wurde durch Messung der Fluoreszenz im UV-Licht und dem Eintauchrefraktometer verfolgt.

c) Lösungsmittel: 2,8%ige Essigsäure und Chloroform. Apparatur wie im vorhergehenden Versuch; 10 Verteilungsschritte wurden nach dem Grundprozeß und anschließend noch 5 nach dem Verfahren der „einphasigen Entnahme“ durchgeführt. Den Essigsäurephasen wurde die Substanz nach Zusatz von Ammoniak durch je dreimaliges Ausschütteln mit Chloroform entzogen.

Analysenkontrollrechnung:

Phasen	Gewicht	Vd %	Vd-Menge	Cd-Menge
0—7	2825 mg	79,4	2245 mg	580 mg
8—10	2330 mg	10,2	238 mg	2092 mg
11—15	3822,5 mg	0	—	3822 mg
	8,98 g (89,8% d. Einwaage)		2,48 g (theoretisch 2,33)	6,49 g (theoretisch 6,64)

Qualitativer Nachweis von Veratridin

50—100 mg Substanz werden mit 2—3 g wasserfreiem $AlCl_3$ verrieben und etwa ½ Stunde im Reagenzglas im Schwefelsäurebad auf 170—180° erhitzt. Der Reaktionskuchen wird mit etwa 50 ccm Wasser aufgenommen und die überschüssige Säure mit Natriumbikarbonat bis p_H7 abgestumpft. Nach Zusatz einiger Tropfen 1%iger $FeCl_3$-Lösung tritt bei Anwesenheit von Veratridin eine Gelbgrünfärbung auf.

Quantitative photometrische Veratridinbestimmung in Veratridin-Cevadin-Gemischen

50—100 mg Substanz werden genau gewogen und mit 10 ccm 72%iger H_2SO_4 in einem Kölbchen im Schwefelsäurebad 15 Minuten auf etwa 180° (Badtemperatur) erhitzt. Der Inhalt des Kölbchens beginnt dabei gerade zu sieden. Das Reaktionsgemisch wird unter guter Kühlung vorsichtig in 40 ccm Wasser gegossen und mit 1 ccm 1%iger $FeCl_3$-Lösung versetzt. Unter weiterer Kühlung werden vorsichtig in kleinen Mengen 30 ccm 25%iges Ammoniak hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß darf dabei nicht mehr als handwarm werden! Die so auf $p_H \sim 9$ gebrachte Mischung wird mit Wasser im Meßkölbchen auf 100 ccm aufgefüllt. Man filtriert durch ein kleines Papierfilter (∅ 8 cm), verwirft die ersten 30—40 ccm des Filtrates und bestimmt die Extinktion des restlichen Filtrates im *Pulfrich*-Photometer (Filter S 50, 1 cm Küvetten). Eichkurve: 10 mg Vd — E = 0,24, 40 mg Vd — E = 0,96. In diesem Intervall beträgt der mittlere Fehler der Einzelbestimmung etwa ± 2 mg.

Die Messungen wurden zum Teil auch mit einem *Lange*-Kolorimeter Modell V nach der Ausschlagsmethode in 1 cm-Küvetten durchgeführt. Von den serienmäßig mit dem Gerät gelieferten Metallinterferenzfiltern eignet sich am besten das blaue Filter (465 mμ). Eichkurve: 13 mg Vd — E = 0,21; 39 mg Vd — E = 0,62.

*

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die Unterstützung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Druck: III-18-127 — KB DG 5000/124/52

Lebenslauf

Am 1. 12. 1926 wurde ich, Johannes Adolf Gregor S t a u s b e r g, als Sohn des Apothekers Johann Heinrich Stausberg und seiner Frau Stephanie, geb. Mauelshagen, zu Leverkusen geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule trat ich 1937 in die Carl-Duisberg-Oberschule in Leverkusen ein. 1944 wurde ich zur Wehrmacht einberufen und verließ die Schule mit dem Reifevermerk. Nach der Entlassung aus amerikanischer Kriegsgefangenschaft im Juli 1945 besuchte ich einen Sonderlehrgang zur Erlangung der Reifeprüfung an der Carl-Duisberg-Oberschule in Leverkusen und bestand Ostern 1946 die Reifeprüfung. Ich trat anschließend in die väterliche Apotheke als Praktikant ein und bestand Herbst 1947 die pharmazeutische Vorprüfung vor der Prüfungskommission der Regierung in Düsseldorf. Von Sommersemester 1948 an besuchte ich 6 Semester lang die Universität Würzburg. Vor der Prüfungskommission der Universität Würzburg legte ich im April 1951 das pharmazeutische Staatsexamen ab und erhielt im November 1951 von dem Bayerischen Ministerium des Innern die Approbation als Apotheker.

Seit dem Sommer-Semester 1951 war ich an dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg mit der Abfassung einer Inauguraldissertation über das Thema „Über das Veratrin mit einem Beitrag zur chemischen Konstitution seiner Bestandteile“ beschäftigt.